

⑬ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

⑪ N° de publication :

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 656 798

⑫ N° d'enregistrement national :

90 00107

⑮ Int Cl⁵ : A 61 K 35/74; C 12 N 1/20/(C 12 N 1/20)(C 12 R 1/245)

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 05.01.90.

③③ Priorité :

④③ Date de la mise à disposition du public de la
demande : 12.07.91 Bulletin 91/28.

⑤⑤ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche : *Se reporter à la fin du présent fascicule.*

⑥⑥ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : TARTUSKY GOSUDARSTVENNY
UNIVERSITET — SU, INSTITUT MEDIKO-
BIOLOGICHESKIKH PROBLEM — SU et
GORKOVSKY NAUCHNO-ISSLEDOVATELSKY
INSTITUT EPIDEMIOLOGII I MIKROBIOLOGII — SU.

⑦② Inventeur(s) : Lentsner Akivo Aronovich, Lentsner
Khelga Peeterovna, Mikelsaar Marika Egonovna, Tjuri
Mall Eugenovna, Brilis Virginius Ionovich, Brilene
Tatyana Anatolievna, Vyalyaots Mai Endelovna, Shilov
Vasily Makarovich, Lizko Nadezhda Nikolaevna,
Levkov Lev Alexeevich, Frolov Vladimir Nikola vich,
Gonchero Igor Borisovich et Sokolova Kira
Yakovlevna.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire : Cabinet Lavoix.

⑤④ Souche de bactéries *Lactobacillus casei* subsp. *casei* 37 pour la préparation d'un produit bactérien doué
d'une activité biologique.

⑤⑦ L'invention concerne la microbiologie. Elle a pour objet
la souche bactérienne *Lactobacillus casei* subsp. *casei* 37,
déposée le 30.06.89 à l'Institut fédéral de génétique et de
sélection de micro-organismes Industriels et enregistrée
sous le numéro BKIIM B-4914.

La souche selon l'invention est utilisée pour la prépara-
tion d'un produit bactérien doué d'une activité biologique
et/ou thérapeutique destiné à la correction et à la stabilité
de la microflore du tube digestif en cas de dysbactérioses
d'étiologies diverses et d'affections de l'appareil urogénital.

FR 2 656 798 - A1



La présente invention concerne la microbiologie, et plus spécialement une souche nouvelle : *Lactobacillus casei* subsp. *casei* 37 pour la préparation d'un produit bactérien doué d'activité biologique (eubiotique), destinée à la correction et à la stabilisation de la microflore du canal digestif en cas de dysbactérioses (déséquilibres bactériologiques) d'étiologies diverses et d'affections de l'appareil urogénital.

Les produits bactériens doués d'activité biologique (eubiotiques) contiennent des cultures vivantes de micro-organismes provenant de la microflore humaine. A ce titre, on utilise largement les lactobacilles.

A l'heure actuelle, on connaît diverses souches des cultures *L. fermentum*, *L. casei*, *L. plantarum*, utilisées pour la préparation de produits bactériens doués d'une activité biologique (US, A, 4314995 ; Society for Intestinal Microbial Ecology and Disease, XIII International Symposium on Intestinal Microecology. Special Meeting of the Society for Intestinal Microbial Ecology and Disease, Porte Conte (Sassari), Sardinia, September 11-14, 1988).

La fréquence des déséquilibres bactériologiques (dysbactérioses) va croissant, d'où un recours de plus en plus large aux eubiotiques, et la nécessité de les perfectionner.

Au fur et à mesure de la multiplication des connaissances sur la fonction protectrice de la microflore humaine et la biologie des micro-organismes qui la constituent, on assiste à une modification des critères du choix des souches productrices d'eubiotiques.

A l'heure actuelle, pour la préparation d'un produit bactérien doué d'une activité biologique (la lactobactérine) à partir de lactobacilles homofermen-

taires, on utilise, entre autres, la souche *Lactobacillus fermentum* 90T-C4 (Ouvrage de référence sur l'utilisation de produits bactériens et viraux, rédigé par S.G. Dzagurova et F.F. Rezepova (en russe), 1975, (Moscou), éditions Meditsina, la Pharmacopée d'Etat de l'U. R. S. S., 1989). En dépit du fait que les souches précitées sont caractérisées par une haute activité antagoniste vis-à-vis des micro-organismes pathogènes et considérés comme pathogènes et résistent bien aux produits antibactériens, tout en étant susceptibles de fournir une grande quantité de biomasse, elles ne présentent ni une haute adhésivité ni une résistance élevée au lysozyme et aux sucs gastriques de l'homme ; or, ce sont justement ces propriétés qui déterminent pour beaucoup le pouvoir colonisant des micro-organismes et, par conséquent, l'efficacité des eubiotiques. Qui plus est, le pouvoir protecteur des diverses espèces de lactobacilles homofermentaires est loin d'être le même.

La souche selon l'invention est nouvelle, et non décrite dans la littérature.

L'invention a pour objectif de fournir une souche nouvelle pour la préparation d'un produit bactérien doué d'une activité biologique, souche présentant non seulement une haute activité antagoniste vis-à-vis des micro-organismes pathogènes et conventionnellement pathogènes et une bonne résistance chromosomique aux produits antibactériens, mais encore une haute adhésivité et une forte résistance au lysozyme et aux sucs gastriques humains.

Le problème ainsi posé est résolu grâce à la présente invention qui a pour objet une nouvelle souche de bactéries : *Lactobacillus casei* subsp. *casei* 37, déposée le 30.06.89 à l'Institut fédéral de génétique et de sélection de micro-organismes industriels et en-

05 enregistrée sous le numéro BKIIM B-4914. La souche selon l'invention présente une haute activité antagoniste vis-à-vis des micro-organismes pathogènes et considérés comme pathogènes, une bonne résistance chromosomique aux produits antibactériens, une adhésivité élevée, une forte résistance au lysozyme et aux sucs gastriques humains.

10 La souche selon l'invention *Lactobacillus casei* subsp. *casei* 37 a été isolée à partir de fèces d'un homme sain sur un milieu sélectif solide ayant la composition suivante (g/litre) : 0,05 de $MnSO_4$; 0,2 de $MgSO_4$; 2,0 de K_2HPO_4 ; 5,0 d'acétate de sodium ; 2,0 de citrate d'ammonium ; 2,0 de glucose ; 10,0 de peptone ; 5,0 de tryptone ; 1,0 de tween-80 ; 0,2 de cystéine ; 50,0 d'autolysat de levures ; 100,0 de décoction
15 de foie ; jusqu'à 0,4 d'acide sorbique ; 25,0 de gélose, le reste étant de l'eau.

On effectue l'incubation dans une atmosphère de gaz carbonique. La souche selon l'invention présente
20 les caractères cultureux et morphologiques et les propriétés physiologiques suivants.

CARACTERES CULTURAUX ET MORPHOLOGIQUES

25 Bâtonnets gram-positifs, courts ou de longueur moyenne, légèrement recourbés, aux extrémités arrondies, disposés en "palissade". Ils n'ont pas de flagelles, ne forment ni de capsules ni de spores. Sur un milieu solide, les colonies sont bombées, opaques, blanchâtres.

30

PROPRIETES PHYSIOLOGIQUES

Les conditions optimales de cultures sont :
37°C dans une atmosphère de gaz carbonique ou de gaz d'éclairage ; la souche croît également en présence
35 d'oxygène. La souche *L. casei* subsp. *casei* 37 décompose le glucose

sans dégagement de gaz ; croît à une température de 15°C, mais ne croît pas en présence de 0,4 % de Tee-pol dans le milieu ; la souche fermente le tagatose, le sorbitol, le cellobiose, le mélézitose, le galactose, le maltose, le saccharose, le mannose, le lactose, la salicine et le mannitol, mais ne fermente pas le rhamnose ; le taux d'acidité dans le lait est de 1,5 %.

L'adhésivité de la souche selon l'invention, comparée à celle de la souche connue *L. plantarum* 8P-A3, a été établie sur un modèle d'érythrocytes humains du groupe O(1) Rh (+), traités au formol, en l'évaluant à l'aide de l'indice d'adhésion moyen. L'adhésivité est considérée nulle pour un indice d'adhésion moyen compris entre 0 et 1,0, basse pour un indice d'adhésion moyen compris entre 1,01 et 2,0, moyenne pour un indice d'adhésion moyen compris entre 2,01 et 4,0, élevée quand cet indice est supérieur à 4,0. La souche *L. casei* subsp. *casei* 37 présente une haute adhésivité (l'indice d'adhésion moyen étant de $6,21 \pm 0,98$), en comparaison de la valeur moyenne de la souche connue *L. plantarum* 8P-A3, dont l'indice d'adhésion moyen est de $3,16 \pm 0,31$.

La sensibilité au lysozyme de la souche selon l'invention a été déterminée sur un milieu solide ayant la composition précédemment indiquée, contenant, en concentrations variées, un lysozyme isolé du blanc d'oeuf.

Les résultats des recherches sur la stabilité de la souche selon l'invention *L. casei* subsp. *casei* 37, comparée à celle de la souche connue *L. plantarum* 8P-A3 sont présentés dans le tableau 1.

TABLEAU 1
STABILITE DES SOUCHES DE LACTOBACILLES
VIS-A-VIS DU LYSOZYME

	(:	L. casei subsp.	:	L. plantarum)
05	(:	casei 37	:	8P-A3)
	(-----)	:	-----	:	-----)
	(Concentration de lysozyme	:		:)
	(dans le milieu nutritif,	:		:)
	(mg/ml	:	50 100	:	50 100)
10	(-----)	:	-----	:	-----)
	(Croissance (+) ou absence	:		:)
	(de croissance (-))	:	+ +	:	+ -)
	(:		:)

15

Il ressort des données présentées dans le Tableau 1 que la souche selon l'invention L. casei subsp. casei 37 se distingue par une résistance plus élevée au lysozyme.

20

La souche selon l'invention présente une résistance élevée au lysozyme et croît encore à une concentration de lysozyme de 100 mg/ml. La souche connue *L. plantarum* 8P-A3 est nettement plus sensible, elle ne croît bien qu'à une concentration de lysozyme non supérieure à 50 mg/ml.

25

Pour déterminer la stabilité de la souche selon l'invention (comparée à celle de la souche connue précitée) vis-à-vis des sucs gastriques de l'homme, on a maintenu pendant 6 heures des suspensions de cultures dans le suc gastrique et le suc duodénal, tant non dilués dans les proportions de 1:2 et de 1:8, en procédant à de nouvelles ensemences sur le milieu solide de la composition sus-indiquée et en dénombrant les colonies apparues. Les résultats de ces recherches sont présentés dans le Tableau 2.

TABLEAU 2
RESISTANCE DES SOUCHES DE LACTOBACILLES
AUX SUCS DIGESTIFS DE L'HOMME

05	(Degré de résistance	: L. casei subsp.	: L. plantarum
	(: casei 37	: 8P-A3
	(-----	: -----	: -----
	(Elevé (plus de 100 colonies	:	:
	(dans un suc non dilué)	: > 100	: > 100
10	(-----	: -----	: -----
	(Moyen (plus de 100 colonies	:	:
	(dans un suc dilué 1:2)	: > 100	: > 100
	(-----	: -----	: -----
	(Bas (26 à 100 colonies dans	:	:
15	(un suc dilué 1:8)	: > 100	: > 100
	(-----	: -----	: -----
	(Nul (moins de 25 colonies	:	:
	(dans un suc dilué 1:8)	: > 100	: > 100
	(:	:

20 Les données présentées dans le Tableau 2 font ressortir que la souche selon l'invention présente une stabilité élevée vis-à-vis des suc digestifs de l'homme identique à celle de la souche connue plantarum 8P-A3.

25 L'activité antagoniste de la souche selon l'invention, comparée à celle de la souche L. plantarum 8P-A3, a été déterminée par la méthode des

30 stries perpendiculaires sur un milieu solide, analogue au milieu précédent mais dépourvu d'acétate de sodium et de citrate d'ammonium et ayant un pH = 7,0. On a utilisé comme micro-organisme de référence les souches Shigella flexneri, Shigella sonnei, Escherichia coli, Proteus vulgaris, Proteus mirabilis, Staphylococcus aureus, Streptococcus faecalis. Une zone

35 d'absence de croissance, large de 10 à 15 mm, corres-

pond à une faible activité antagoniste, de 16 à 20 mm à une activité moyenne, de 21 à 25 mm à une activité élevée, et de 26 mm et davantage à une activité très élevée. L'activité antagoniste de la souche selon
05 l'invention L. casei subsp. casei 37 (ainsi que celle de la souche connue) vis-à-vis de Streptococcus faecalis est élevée, et très élevée vis-à-vis de tous les autres micro-organismes de référence.

La sensibilité de ces souches à des produits antibactériens a été déterminée par la méthode
10 de diffusion dans la gélose avec recours aux disques de papier sur un milieu solide analogue. Les deux souches sont stables vis-à-vis des produits antibactériens couramment utilisés dans la pratique médicale : la streptomycine, la monomycine, la néomycine,
15 la kanamycine, la ristomycine, la polymyxine, la céphaloridine et la gentamycine ; elles sont modérément stables vis-à-vis de la méticilline et de la spiramycine. L'absence de R-plasmides chez les souches confirme la nature chromosomique de la résistance aux
20 antibiotiques.

Un essai de toxicité de la souche selon l'invention sur des souris blanches, a permis de conclure à son innocuité. La composition nucléotique de l'ADN de la souche selon l'invention L. casei subsp. casei 37 donne un pourcentage G + C =
25 41,9.

La souche selon l'invention est utilisée pour la préparation d'un produit bactérien doué
30 d'une activité biologique et/ou thérapeutique qui constitue par conséquent un second objet de l'invention. Le produit bactérien est administré par voie orale. On a étudié l'influence qu'exerce le produit bactérien doué d'activité biologique, obtenu à partir de la souche selon l'invention, sur
35

l'état de la biocénose microbienne de l'intestin chez les animaux.

05 Les recherches ont été effectuées dans un groupe expérimental (14 animaux) et un groupe témoin (10 animaux) de singes de l'espèce *Macaca mulatta*, âgés de 2,5 à 3 ans, qui vivaient dans un milieu spécialisé.

10 La biocénose microbienne intestinale a été étudiée par des méthodes classiques et après introduction pendant 7 jours de la lactobactérie parallèlement à l'administration d'antibiotiques (lévomycétine, gentamycine) chez les animaux du groupe expérimental. Les primates du groupe témoin, qui ne recevaient que les antibiotiques, ont été examinés
15 dans les mêmes délais. Les résultats des recherches sont présentés dans le Tableau 3.

TABLEAU 3

Groupe de micro-organismes	Quantité de micro-organismes en log/g (M ± mt)	groupe témoin (sans administration du produit bactérien)	groupe expérimental (traité par le produit bactérien)
Aérobies	9,04 ± 0,37	8,58 ± 0,32	7,78 ± 0,43
Anaérobies	9,45 ± 0,33	8,85 ± 0,25	9,09 ± 0,07
Colibacille	5,29 ± 0,14	7,29 ± 0,82	4,47 ± 0,37
Entérobactéries considérées comme pathogènes (Proteus)	4,45 ± 0,45	5,31 ± 0,81	4,19 ± 0,43
Staphylocoques	3,33 ± 0,67	6,67 ± 0,33	4,13 ± 0,30
Entérocoques	5,94 ± 0,40	néant	3,72 ± 0,19
Lactobacilles	6,39 ± 0,46	7,25 ± 0,71	5,07 ± 0,52
Levures	8,62 ± 0,15	7,88 ± 0,17	7,32 ± 0,49
	5,35 ± 0,22	5,22 ± 0,52	3,83 ± 0,74

Les résultats présentés dans le Tableau 3 font ressortir que les primates du groupe témoin accusent une diminution de la quantité de lactobacilles et de la quantité totale de bactéries anaérobies, ainsi qu'un accroissement du taux de colibacilles, de proteus et d'entérocoques.

Dans le même temps, chez les primates du groupe expérimental, on a constaté une normalisation du taux de lactobacilles. En outre, les taux de colibacilles et de proteus ne sont pas augmentés.

Les résultats des travaux effectués montrent par conséquent une influence bénéfique d'activité biologique, administré sur une période de 7 jours, pour la préparation duquel on a utilisé la souche selon l'invention L. casei subsp. casei 37. Cette influence s'exerce sur la composition de la microflore intestinale des primates, et se traduit par la restauration d'une biocénose microbienne normale de l'intestin, alors que chez les animaux qui ne recevaient que les antibiotiques on a constaté des troubles importants de la microflore, allant jusqu'à l'apparition de dysbactériose du 3^e degré (I.N. Blokhina, V.G. Dorofeichuk, Les Dysbactérioses (en russe), 1979, (Leningrad), Editions Meditsina).

On a également effectué des essais du produit bactérien doué d'activité biologique, pour la préparation duquel on a utilisé la souche selon l'invention, pour déterminer l'ensemble des propriétés thérapeutiques (possibilité de rétablir la biocénose microbienne perturbée de l'intestin dans de brefs délais et son optimisation).

Les essais ont été effectués sur des volontaires sains âgés de 30 à 40 ans dans des conditions de laboratoire. Les conditions des essais étaient les suivantes : les volontaires du groupe

expérimental et du groupe témoin (constitués de 6 personnes chacun) avaient subi un bilan de l'ensemble de la microflore des fèces afin de déterminer l'état de la biocénose microbienne intestinale. Après administration orale de tétracycline à raison de 0,25 g 4 fois par jour pendant 5 jours, on administrait le produit bactérien doué d'une propriété biologique, préparé à partir de la souche *L. casei* subsp. *casei* 37 (groupe expérimental) et de la souche *L. plantarum* 8P-A3 (groupe témoin).

La prise du produit bactérien avait lieu 40 à 60 mn avant les repas, à raison de 2 comprimés 2 ou 3 fois par jour durant 10 à 14 jours. A l'issue du traitement, on avait examiné la microflore des fèces.

Les données comparatives relatives à la normalisation de la biocénose microbienne de l'intestin dans le groupe expérimental et le groupe témoin sont présentées dans le Tableau 4.

TABLEAU 4
 VARIATIONS DES TAUX DE DIVERS GROUPES DE MICRO-ORGANISMES
 APRES ADMINISTRATION DU PRODUIT BACTERIEN SELON L'INVENTION

Groupes de micro-organismes	Quantité de micro-organismes en log/g		
	Etat initial	Après administration de l'anti-biotique	du produit bactérien de la souche L. casei subsp. casei 37
1	2	3	4
Colibacilles	7,5 ± 0,4	4,4 ± 0,3	7,0 ± 0,5
Colibacilles ayant une activité fermentaire réduite	néant	8,7 ± 0,5	néant
Proteus	2,7 ± 0,3	5,3 ± 0,6	2,2 ± 0,4
Lactobacilles	7,1 ± 0,2	4,2 ± 0,3	6,9 ± 0,5
Bifidobactéries	8,7 ± 0,4	6,2 ± 0,6	9,1 ± 0,2
Clostridies	3,1 ± 0,7	6,1 ± 0,7	2,9 ± 0,5
Etat de la biocénose microbienne de l'intestin	normale	dysbactériose du III. degré	normale

TABLEAU 4 (suite)

Groupes de micro-organismes	Quantité de micro-organismes en log/g						
	Etat initial		Après administration				
			de l'anti-biotique		du produit bactérien de la souche I. plantarum 8P-A3		
1	5		6		7		
Colibacilles	6,6 ± 0,5		4,8 ± 0,4		7,8 ± 0,6		
Colibacilles ayant une acti- vité fermentaire réduite	néant		8,3 ± 0,2		5,2 ± 0,6		
Proteus	3,0 ± 0,4		6,0 ± 0,7		3,4 ± 0,7		
Lactobacilles	6,6 ± 0,3		5,1 ± 0,6		5,7 ± 0,5		
Bifidobactéries	8,9 ± 0,5		6,5 ± 0,4		8,6 ± 0,8		
Clostridies	3,2 ± 0,8		5,7 ± 0,9		4,2 ± 0,4		
Etat de la biocénose microbienne (de l'intestin	normale		dysbactériose du IV degré		dysbactériose du I degré		

Il ressort du Tableau 4 que la mise en oeuvre du produit bactérien doué d'une activité biologique et/ou thérapeutique, préparé à partir de la souche selon l'invention conduit à la normalisation du taux de proteus et de celui de clostridies, au rétablissement du taux de lactobacilles et à la prédominance, typique pour l'eubiose, des espèces de colibacilles à fermentation normale, ainsi qu'à la domination optimale des bifidobactéries sur les colibacilles.

Chez les sujets du groupe témoin, qui ont reçu le produit bactérien doué d'une activité biologique, préparé à partir de la souche *L. plantarum* 8P-A3, le taux de lactobacilles n'a pas atteint le niveau de départ, le taux de proteus et celui de clostridies l'ont dépassé et on n'a pas constaté un rétablissement complet des colibacilles.

L'état de la microflore de l'intestin a été défini comme une dysbactériose du I degré.

Les essais effectués ont donc mis en évidence ce qu'avec l'administration de la souche selon l'invention on a les avantages suivants par rapport à la souche connue :

- une réduction plus sensible des taux de proteus et de clostridies ;
- un accroissement plus substantielle du taux de lactobacilles ;
- le rétablissement tant du niveau quantitatif que de la composition qualitative des colibacilles ;
- la normalisation de la biocénose microbienne de l'intestin dans son ensemble. ;

Le produit bactérien doué d'une activité biologique, préparé à partir de la souche selon l'invention, est inoffensif, non toxique et assure la normalisation de la microflor intestinale en 10 à 14 jours à partir du moment de l'arrêt de la prise des

antibiotiques.

Le produit bactérien, doué d'une activité biologique, préparé à partir de la souche selon l'invention, est utilisable :

- 05 - pour le traitement et la prévention des infections de l'appareil urogénital, des vaginites et des vaginoses ;
- en cas d'affections infectieuses et non infectieuses du tube digestif, qui s'accompagnent d'une
- 10 dysbiose ;
- en cas de chimiothérapie antibactérienne prolongée, de traitement par irradiation et d'utilisation d'immunodépresseurs ;
- dans les situations de stress.

- 15 L'incubation de la souche selon l'invention s'effectue de la manière suivante.

On prépare un milieu nutritif constitué pour un tiers de lait et de levures et pour deux tiers d'un mélange contenant du sulfate de manganèse, du sulfate de magnésium, de l'hydrogénophosphate de potassium, de l'acétate de sodium, du citrate d'ammonium, du glucose, de la peptone, de la tryptone, du Tween-80, de la cystéine, un autolysat de levures, une décoction de foie, de l'acide sorbique. On y ajoute

20 de la gélatine, de l'amidon, de l'acide folique et du glucose.

Ensuite, on procède à la préparation de la culture mère.

- 30 Une culture lyophilisée contenue dans des ampoules ou des flacons est diluée avec un milieu ayant une composition analogue à celle précédemment décrite puis mise à incuber pendant 6 heures, ce qui fournit une première génération. Une seconde génération est obtenue à la suite d'une nouvelle incubation
- 35 dans un même milieu pendant 17 ± 1 heures, et une

troisième génération, en effectuant une incubation dans un milieu analogue, également pendant 17 ± 1 heures.

05 On transfère la culture mère dans un réacteur et on la met à incuber pendant 8 à 12 heures à une température de 37°C dans une atmosphère d'azote, le pH étant maintenu entre 5,8 et 6,2.

La biomasse refroidie est concentrée et congelée à une température inférieure à -38°C .

10 La biomasse congelée est séchée par lyophilisation.

La biomasse lyophilisée ainsi obtenue est utilisée comme principe actif d'un produit bactérien doué d'une activité biologique, qui présente une haute
15 activité antagoniste vis-à-vis de plusieurs micro-organismes pathogènes et considérés comme pathogènes se développant dans l'intestin et qui résiste bien aux produits antibactériens les plus couramment utilisés dans la pratique clinique et qui est également inoffensif
20 et non toxique.

Afin de mieux faire comprendre l'invention, on donne ci-après l'exemple non limitatif suivant de l'incubation de la souche selon l'invention.

EXEMPLE

25 On prépare l'ensemencement en introduisant la souche *Lactobacillus casei* subsp. *casei* 37 dans un milieu nutritif constitué pour un tiers de l'ait et de levures, et pour deux tiers d'un mélange de la composition suivante (en g/litre) :

30

	MnSO_4	0,05
	MgSO_4	0,2
	K_2HPO_4	2,0
	acétate de sodium	5,0
35	citrate d'ammonium	2,0

	glucose	2,0
	peptone	10,0
	tryptone	5,0
	Tween-80	1,0
05	cystéine	0,2
	autolysat de levures	50,0
	décoction de foie	100,0
	acide sorbique	jusqu'à 0,4
	eau	le reste.

10

On ajoute au milieu nutritif de la gélatine, de l'amidon, de l'acide folique et du glucose. On laisse incuber pendant 6 heures à une température de 37°C, pour obtenir une première génération. On obtient

15 une seconde génération à la suite d'un nouvel ensemencement sur un même milieu pendant 17 h. Ensuite, pour obtenir une troisième génération, on effectue une incubation pendant 17 heures dans un milieu nutritif analogue. On transfère la culture mère ainsi obtenue

20 dans le milieu d'incubation (la composition du milieu étant analogue à celle qui a été précédemment décrite) dans un rapport volumique de 1:10 et on effectue l'incubation à une température de 37°C dans une atmosphère d'azote, le pH étant de 5,8. La biomasse qui en résulte

25 te contient 8.10^9 cellules vivantes de la culture dans 1 ml. La biomasse obtenue est refroidie, concentrée d'un ordre de 10 par filtration, congelée à une température de -38°C puis séchée par lyophilisation.

REVENDICATIONS

05 1. Souche bactérienne *Lactobacillus casei* subsp. *casei* 37, déposée le 30.06.89 à l'Institut fédéral de génétique et de sélection de micro-organismes industriels et enregistrée sous le numéro BKIIM B-4914.

10 2. Produit bactérien ayant une activité biologique et/ou thérapeutique comprenant à titre d'ingrédient actif la souche bactérienne selon la revendication 1.

3. Produit bactérien selon la revendication 2, utilisable pour la normalisation de la microflore intestinale.

REPUBLIQUE FRANÇAISE

2656798

N° d'enregistrement
national

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

FR 9000107
FA 436770

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	FR-A-2508282 (SCHULER R. ET AL) * le document en entier *	1-3
A	EP-A-271364 (BIOREM) * le document en entier *	1-3
A, D	US-A-4314995 (KOSEI HATA ET AL) * le document en entier *	1-3
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
		C12R A61K
Date d'achèvement de la recherche 14 AOUT 1990		Examineur AVEDIKIAN P. F.
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons</p> <p>& : membre de la même famille, document correspondant</p>		

EPO FORM 150 (3.82 (P0413))